

Deteksi Taura Syndrome Virus (TSV) pada udang penaeid dengan metode histopatologi



© BSN 2011

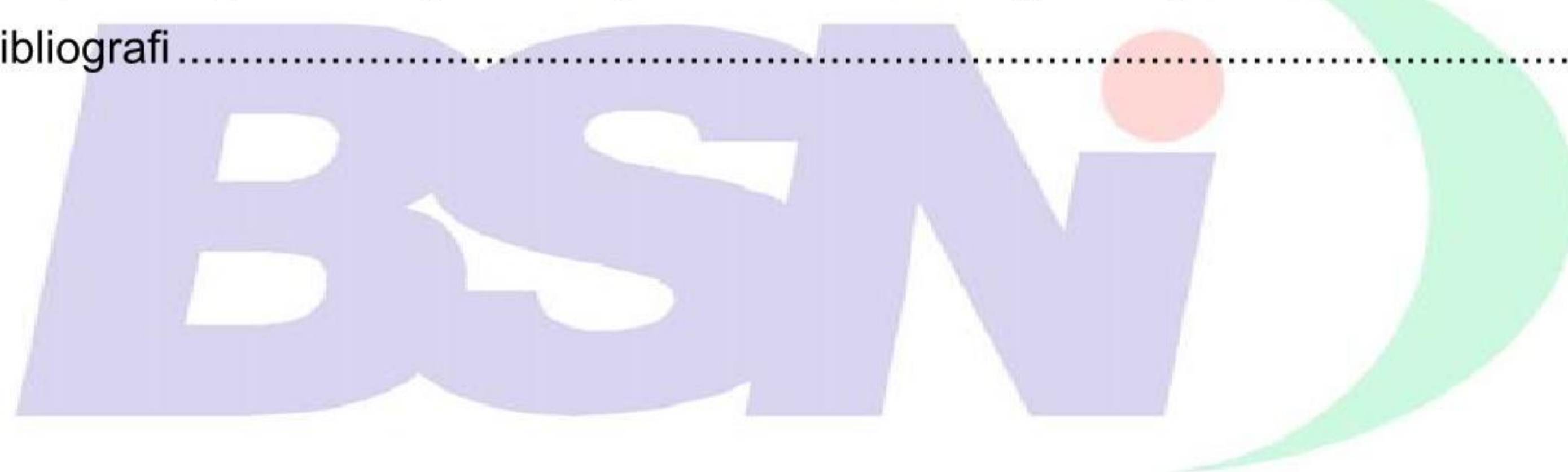
Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Peralatan	3
4 Bahan	4
5 Prosedur	4
6 Interpretasi hasil	6
Lampiran A (normatif) Pembuatan pereaksi	8
Lampiran B (normatif) Diagram alir dan bahan kimia yang diperlukan dalam proses jaringan pada <i>automatic tissue processor</i>	10
Lampiran C (normatif) Prosedur pewarnaan <i>hematoxylen - eosin</i>	11
Lampiran D (informatif) Contoh gambaran hispatologi udang penaeid	12
Bibliografi	16



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *Taura Syndrome Virus* (TSV) pada udang *Penaeid* dengan metode histopatologi.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat – rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Juni 2010 di Bandung, dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan :

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Januari 2011 sampai dengan 25 Maret 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Taura Syndrome Virus* (TSV) pada udang penaeid dengan metode histopatologi

1 Ruang lingkup

Standar ini menjelaskan metode deteksi TSV pada udang penaeid dengan metode histopatologi.

2 Istilah dan definisi

2.1

badan inklusi intranukleus (*intranuclear inclusion body*)

inti sel yang membesar karena adanya reaksi spesifik dari inti sel yang diakibatkan adanya penetrasi virus

2.2

basofilik

bagian sel yang mampu menyerap zat pewarna *haematoxylene* sehingga sel berwarna ungu atau biru

2.3

clearing

cara penjernihan dan pengeluaran sisa alkohol dari dalam sel/jaringan

2.4

diagnosa

metode diagnosa yang diakui secara internasional

2.5

dissecting set

seperangkat alat bedah berfungsi untuk membedah contoh dan mencari organ target untuk pengamatan

2.6

drying bench

alat untuk mengeringkan dan melekatkan potongan jaringan pada *slide* yang diangkat dari *floating bath*

2.7

embedding

cara pencetakan organ dengan parafin (dengan titik didih 52 °C - 58 °C) untuk memudahkan pengaturan dalam pemotongan jaringan

2.8

eosinofilik/asidofilik

bagian sel yang mampu menyerap zat pewarna *eosin* sehingga berwarna merah

2.9

fiksasi

cara pengawetan organ agar struktur sel dan jaringan tidak rusak paska kematian

2.10

fiksatif

larutan yang digunakan untuk mempertahankan jaringan tanpa menyebabkan perubahan strukturnya

SNI 7667:2011

2.11

floating bath

penangas air pada suhu tertentu (40 °C - 45 °C) untuk meregangkan hasil pemotongan jaringan dari mikrotom

2.12

hemolymph

cairan darah yang bercampur limfe

2.13

histo-embedder

alat untuk pencetakan sampel dalam blok parafin setelah *infiltrasi* parafin

2.14

histopatologi

ilmu yang mempelajari perubahan abnormal sel jaringan tubuh

2.15

hypertropi

peningkatan ukuran dari suatu jaringan yang disebabkan oleh meningkatnya ukuran sel

2.16

infiltrasi parafin

cara penyusupan parafin ke dalam sel/jaringan yang dilangsungkan pada titik didih parafin (52 °C - 58 °C) untuk memudahkan pemotongan jaringan

2.17

jaringan

kumpulan sel yang mempunyai struktur dan fungsi sama, yang menjadi objek pemeriksaan histopatologi

2.18

karioreksis

perubahan nukleus ditandai dengan adanya fragmentasi nukleus menjadi beberapa bagian kecil

2.19

kromatin

bagian inti sel yang lebih mudah terwarnai, membentuk suatu jaringan *fibril nuclear*

2.20

mikrotom

alat yang digunakan untuk memotong jaringan sesuai ketebalan yang diinginkan

2.21

minyak imersi

minyak yang digunakan untuk memperbesar A.N (*Aperture Numerik*) sebagai faktor yang menentukan besarnya "*Airy Disc*" (besarnya layar) dan mempunyai hubungan langsung dengan kemampuan maksimum mikroskop dalam membedakan 2 buah titik terdekat secara terpisah

2.22

mounting

menutup preparat dengan *cover glass* yang telah ditetesi perekat (*mounting agent*)

2.23

organ target

organ yang menjadi sasaran infeksi patogen (virus) dan digunakan sebagai objek pemeriksaan

2.24**piknotik**

adanya perubahan pada nukleus ditandai oleh adanya kondensasi kromatin nukleus menjadi suatu massa yang terwarnai lebih gelap, homogen dan lebih kecil dari nukleus normal

2.25**penyakit viral**

penyakit yang disebabkan oleh virus

2.26**preparasi jaringan**

teknik pemotongan organ target untuk memudahkan pengamatan jaringan

2.27**sel**

bagian terkecil penyusun jaringan yang mampu bermetabolisme dan menjadi objek dalam pemeriksaan penyakit dengan metoda histopatologik

2.28**staining set (staining jar)**

gelas tempat pewarnaan irisan jaringan

2.29**syringe**

tempat pewarnaan irisan jaringan

2.30**Taura Syndrome (TS)**

penyakit udang yang disebabkan oleh virus *Taura Syndrome* (RNA), dari famili *Dicistroviridae*

2.31**tissue processor**

alat dalam proses histopatologi bekerja secara *automatic* atau *manual* dipergunakan untuk memproses jaringan contoh untuk dehidrasi, *clearing* dan *infiltrasi* parafin

2.32**trimming**

teknik pemotongan blok parafin untuk mendapat bentuk yang memudahkan pemotongan sampel pada mikrotom, sehingga lebih efisien dan baik

3 Peralatan

- a) alat bedah (*disecting set*);
- b) alat pemotong jaringan (mikrotom);
- c) alat untuk memproses jaringan (*tissue processor*);
- d) *drying bench*;
- e) *floating bath*;
- f) gelas penutup;
- g) gelas preparat;
- h) *histo-embedder*;
- i) masker;
- j) mikroskop;
- k) *paraffin mold*;
- l) sarung tangan;
- m) *staining set*.

4 Bahan

- a) akuades;
- b) alkohol absolut (p.a);
- c) *cassette embedding*;
- d) *chloroform*;
- e) *eosin Y*;
- f) *entellan*;
- g) *ethyl* alkohol 50 % - 70 %;
- h) *fiksatif*;
- i) *hematoxylene*;
- j) *parafin crumble* dengan titik didih 58 °C - 60 °C;
- k) *xylol*.

CATATAN Pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

5 Prosedur

5.1 Fiksasi

1. Siapkan persediaan fiksatif secukupnya. Aturan secara umum sedikitnya 10 (sepuluh) volume fiksatif harus digunakan untuk 1 (satu) volume contoh jaringan (yaitu : 10 g contoh udang memerlukan 100 ml fiksatif); (apabila fiksatif yang digunakan *davidson* setelah semalaman harus segera dinetralkan dengan formalin 10 %).
2. Lakukan fiksasi dengan perendaman dalam fiksatif untuk udang ukuran larva dan awal *post* larva.
3. Lakukan fiksasi dengan penyuntikan menggunakan larutan fiksatif untuk udang besar/tokolan keatas (ukuran diatas 1 gram) atau *post* larva besar (> PL 20).
4. Injeksi *hepatopankreas* sebanyak dua atau tiga kali hingga rata sehingga warnanya berubah dari putih menjadi oranye; kemudian injeksi dengan fiksatif ke bagian *cephalotorax* ke bagian abdomen anterior dan kebagian abdomen posterior.
5. Rendam contoh dalam fiksatif pada suhu ruang selama 24 jam - 72 jam tergantung pada ukuran udang.
6. Setelah difiksasi, pindahkan contoh ke dalam *ethyl alcohol* 70 % sehingga dapat disimpan dalam waktu lama.

5.2 Preparasi organ atau jaringan target

Preparasi jaringan dari target contoh disesuaikan dengan ukuran inang yang terinfeksi:

- a) Udang berukuran besar, jaringan yang diambil adalah bagian anggota tubuh yang mengalami perubahan atau kerusakan fisik, pada kulit, sirip, lambung dan saluran pencernaan.
- b) Udang berukuran kecil, seluruh tubuhnya dapat digunakan dalam preparasi jaringan.

Setiap organ target diambil 0.3 cm² - 0.5 cm² dimasukkan ke dalam *cassette embedding*.

5.3 Dehidrasi, *clearing* dan *infiltrasi* organ atau jaringan (Proses ini dapat menggunakan *automatic tissue processor* atau *manual tissue processor* seperti pada Lampiran B)

5.3.1 Dehidrasi

Merupakan cara pengeluaran air dari jaringan dengan menggunakan alkohol bertingkat dimulai dari alkohol 70 % sampai 100 %. Apabila jaringan masih keruh pada proses *clearing*, maka proses dehidrasi harus diulang.

5.3.2 *Clearing*

Proses diatas kemudian dipindahkan ke *xylo* I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 1,5 jam, lalu dipindahkan ke *xylo* II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 1,5 jam, kemudian dipindahkan ke *xylo* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) selama 1,5 jam

CATATAN *Clearing* bertujuan untuk menghilangkan bahan kimia dehidrasi sehingga contoh menjadi transparan dan bahan ini mempunyai sifat mampu menggantikan bahan kimia dehidrasi dan melarutkan parafin.

5.3.3 *Infiltrasi*

Contoh dipindahkan ke parafin cair I (kesatu) selama 1,5 jam, kemudian dipindahkan ke parafin cair II (kedua) selama 1,5 jam pada suhu 60 °C.

CATATAN *Infiltrasi* merupakan cara penyusupan parafin ke dalam jaringan contoh yang bertujuan untuk menggantikan *xylo* sehingga contoh tidak rusak pada waktu dilakukan pemotongan dengan mikrotom.

5.4 Blocking

Contoh organ atau jaringan diambil dan ditempatkan pada *paraffin mold* dengan posisi sesuai tun pemeriksaan kemudian ditambahkan parafin cair dan ditutup dengan *cassette embedding*. Selanjutnya dibekukan dan siap untuk dipotong. Sebelum dipotong dilakukan proses *trimming*.

5.5 Pemotongan organ atau jaringan

Pemotongan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 4 µm - 5 µm. Hasil pemotongan diregangkan pada slide yang dibasahi alkohol 70% kemudian secara berhati-hati diletakkan pada permukaan air pada floating bath yang bersuhu 42 °C - 45 °C. Selanjutnya dilakukan penempelan irisan pada gelas objek yang telah dibersihkan dengan etanol 70 %.

5.6 Pewarnaan jaringan dan sediaan preparat

5.6.1 Deparafinasi

Contoh sediaan (*slide*) yang akan diperiksa direndam dalam *xylo* I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 15 menit, kemudian dipindahkan dan direndam dalam larutan *xylo* II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 15 menit dan *xylo* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) 10 menit.

5.6.2 Rehidrasi

Air diberikan pada contoh jaringan dari etanol konsentrasi tinggi ke etanol konsentrasi rendah, dengan cara:

- Contoh direndam dalam etanol absolut I (kesatu) selama 10 menit lalu contoh dipindahkan dan direndam dalam etanol absolut II (kedua) selama 2 menit.
- Selanjutnya, dipindahkan dan direndam dalam etanol 95 % selama 5 menit, etanol 90 % selama 5 menit, etanol 70 % selama 3 menit dan dibilas dalam air mengalir selama 2 menit kemudian bilas kembali dengan akuades selama 3 menit

5.6.3 Pewarnaan

Dalam pewarnaan ini dipergunakan teknik pewarnaan *hematoxylene* dan *eosin*. Contoh dipindahkan dan direndam dalam *hematoxylene* selama 1,5 menit kemudian dibilas dengan air mengalir selama 8 menit, lalu dipindahkan dan direndam dalam akuades selama 3 menit. Selanjutnya, direndam dalam *eosin* selama 30 menit sampai dengan 60 menit.

CATATAN Teknik pewarnaan *hematoxylen-eosin* digambarkan pada Lampiran C.

5.6.4 Dehidrasi dan *clearing*

- Sediaan direndam dalam etanol 70 % selama 1 menit.
- Selanjutnya sediaan direndam dalam etanol 90 % selama 1 menit, etanol 95 % selama 1 menit, etanol 100 % I (kesatu) selama 1 menit, etanol 100 % II (kedua) selama 1 menit, campuran etanol : *xylo*l (1:1) selama 1 menit, *xylo*l I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 3 menit, *xylo*l II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 5 menit, *xylo*l III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) selama 5 menit.

5.6.5 Mounting

Angkat sediaan lalu dibersihkan sekelilingnya kemudian ditetesi dengan *entellan*.

CATATAN *mounting* merupakan proses perekatan gelas penutup dengan zat perekat supaya sediaan jaringan tidak rusak.

6 Interpretasi hasil

- Sel-sel yang terinfeksi merupakan jaringan pengikat subkultikular dan berbatasan dengan otot (bergaris) yang membentuk dasar dari epitelium kultikular.
- Pembacaan hasil untuk diagnosa dengan metoda komparasi dengan menggunakan mikroskop
- Preparat menunjukkan positif TSV ditunjukkan adanya kumpulan badan inklusi intrasitoplasmik berbentuk inklusi sitoplasma yang membulat (*spherical*) yang bersifat eosinofilik dan basofilik dengan diameter 1 μ m - 20 μ m.
 - Fase akut lesi TSV dalam epidermis subkutikular dari *P.vannamei* karioreksis ditunjukkan pada Gambar D.1.
 - Fase akut lesi TSV pada sel epidermis insang dari *P.vannamei* dan fase lesi kronis dari organ limfoid dari *P. vannamei* dengan detail *speroid* dalam gambar inset ditunjukkan pada Gambar D.2
 - Sel-sel jaringan ikat yang nukleusnya mengalami piknotik dan karioreksis ditunjukkan pada Gambar D.3 – Gambar D.7.
 - serta adanya variasi penyerapan warna oleh lesi perakut ditunjukkan dengan tidak adanya *hemocytes* di lesi atau jaringan otot dasar ditunjukkan pada gambar D.4, Gambar D.5, dan Gambar D.6

- *Piknosis* nukleus dan variasi pewarnaan yang besar berupa inklusi sitoplasma yang membulat dan/atau badan intraselular (panah) merupakan karakteristik dari *lesi* TSV garis skala = 10 μm ditunjukkan pada Gambar D.5 dan Gambar D.7 sedangkan *lesi* TSV garis skala = 5 μm ditunjukkan pada Gambar D.6.



Lampiran A (normatif) Pembuatan pereaksi

A.1 Pembuatan larutan eosin

a. Pembuatan larutan stok eosin

– eosin y	1 g
– akuades	100 ml

b. Pembuatan larutan eosin yang siap digunakan

– larutan stok eosin	35 ml
– etanol 80%	110 ml
– phloksin 1%	5 ml
– asam asetat glacial	1,5 ml

A.2 Pembuatan larutan *hematoxylene*

– <i>hematoxylene crystal</i>	2,5 g
– <i>etanol absolut</i> (95 %)	50 ml
– <i>ammonium alum</i> atau <i>potassium alum</i>	50 g
– akuades	500 g
– <i>mercurie oxida</i>	1,5 g
– asam asetat glacial	20 ml

Cara membuat:

- Larutkan *hematoxylene* dalam etanol absolute.
- Larutkan ammonium alum atau potassium alum dalam akuades.
- Campurkan a dan b, didihkan.
- Tambahkan merkuri oksida, dinginkan pada air es.
- Nukleus akan terwarnai dengan baik bila pada larutan ditambahkan asam asetat.
- Saring dengan kertas saring.

A.3 Pembuatan larutan *buffer* netral formalin 10%

– <i>fomaldehyda</i> 37%	100 ml
– akuades	900 ml
– <i>natrium difosfat</i> (NaH_2PO_4)	4 g
– <i>natrium fosfat</i>	6 g

Cara membuat:

Campurkan semua bahan di atas.

A.4 Pembuatan larutan *Bouin's*

– asam pikrat jenuh, yang dilarutkan dengan akuades sampai jenuh	750 ml
– formalin 37 % - 40 %	250 ml
– asam asetat glacial	50 ml – 100 ml

Cara membuat:

Buat stok larutan asam pikrat jenuh dengan akuades, kemudian ambil 750 ml dan tambahkan formalin 37 % - 40 % sebanyak 250 ml. Terakhir tambahkan asam asetat glasial 50 ml.

A.5 Pembuatan etanol 70 %

- etanol absolute (p.a) 700 ml
- akuades 300 ml

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 70 : 30

A.6 Pembuatan etanol 90 %

- etanol absolute (p.a) 900 ml
- akuades 100 ml

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 90 : 10

A.7 Pembuatan etanol 95 %

- etanol absolute (p.a) 950 ml
- akuades 50 ml

Cara membuat:

Campurkan alkohol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 95 : 5

A.8 Pembuatan larutan *Davidson*

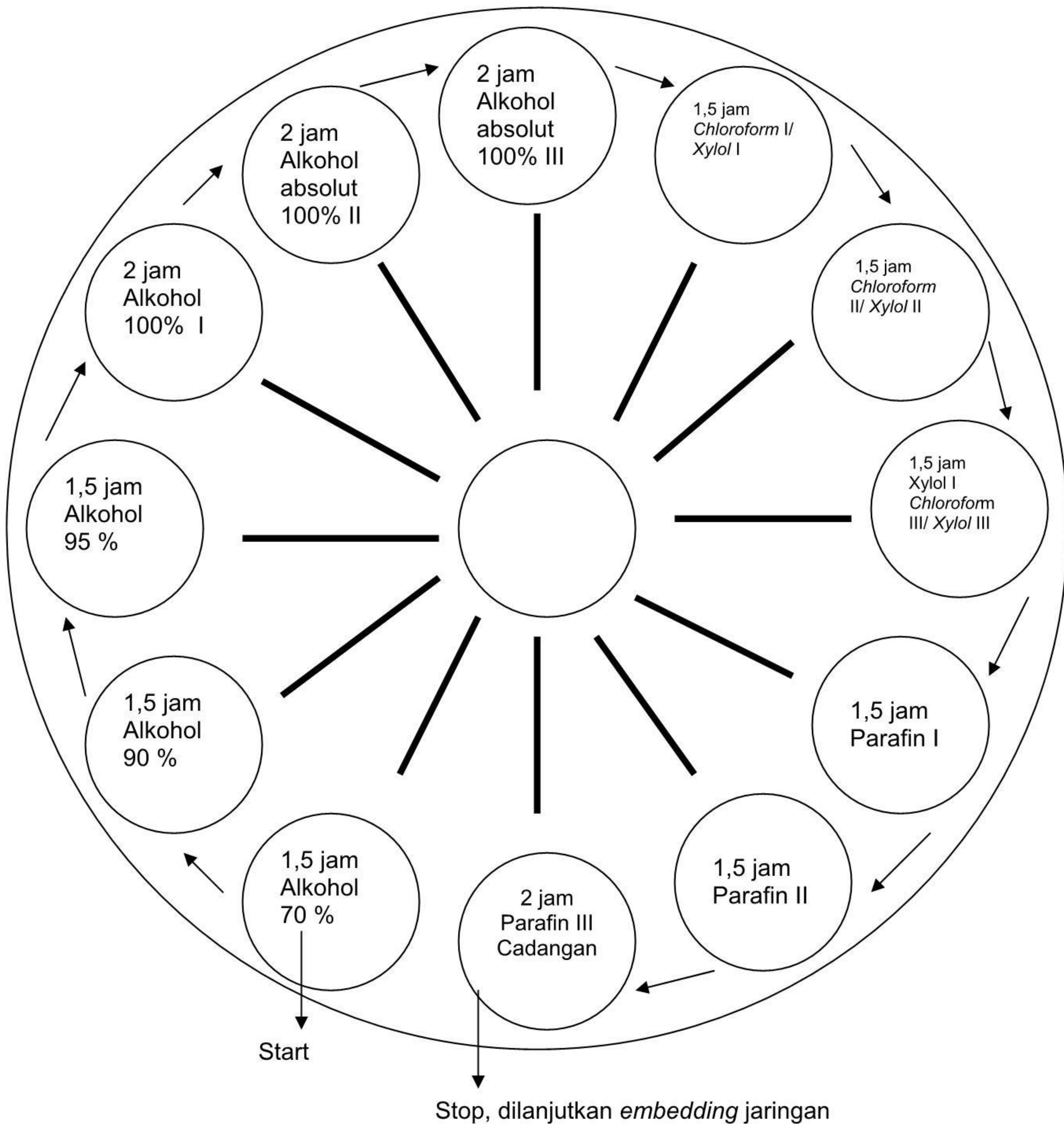
- etanol absolut 330 ml
- *formaldehyde* (36 % - 38 %) 220 ml
- *asam asetat glasial* 115 ml
- akuades 335 ml

Cara membuat :

Larutkan formulasi di atas menjadi satu kemudian baru digunakan.

Lampiran B
(normatif)

Diagram alir dan bahan kimia yang diperlukan dalam proses jaringan pada *automatic tissue processor*



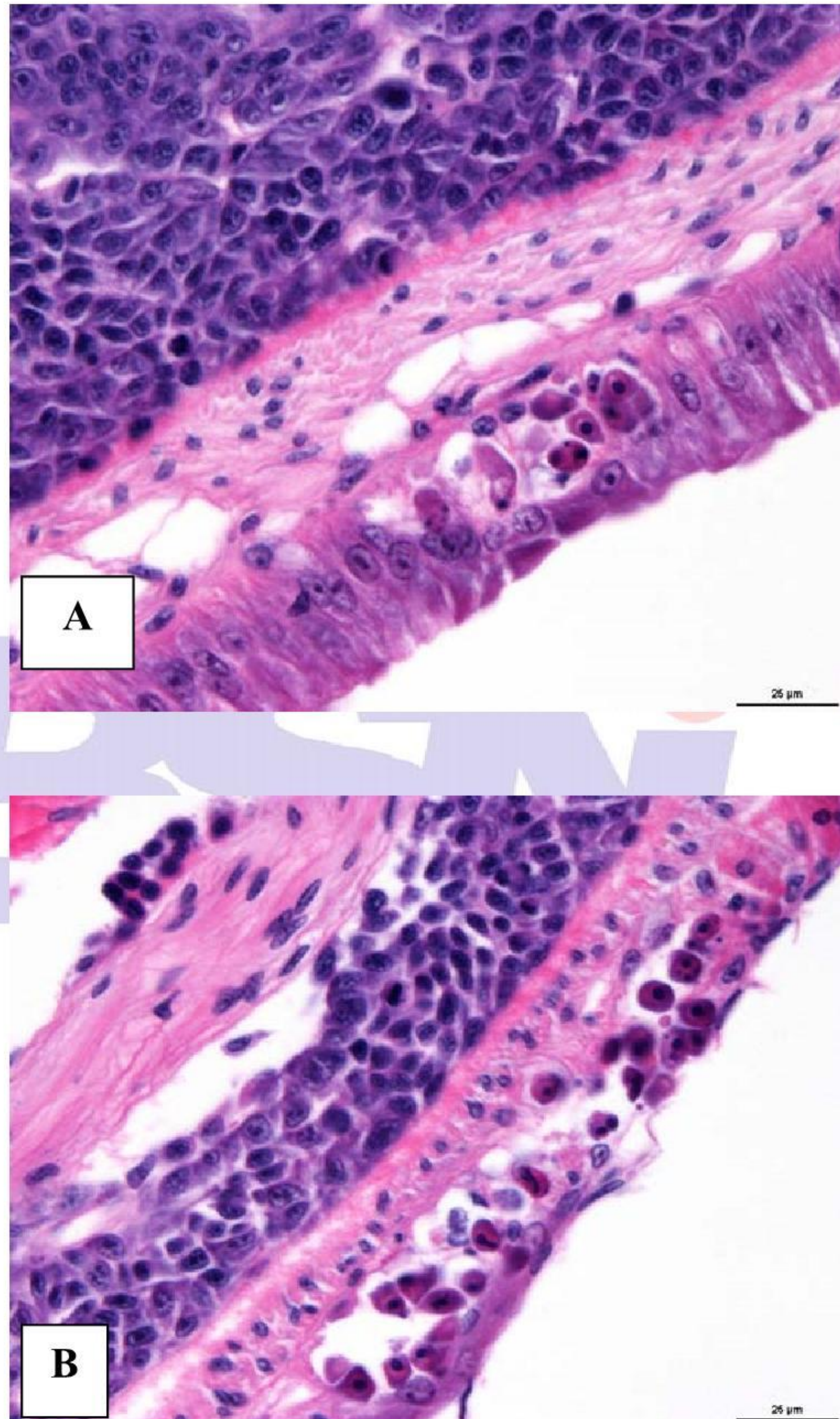
Gambar B.1 - Diagram alur dan bahan untuk proses jaringan pada *automatic tissue processor*. Proses dehidrasi (dari etanol 70% s.d etanol 100%), proses *clearing* (dari *xylol I* /*chloroform I* s.d *xylol III*/*chloroform III*), dan proses infiltrasi parafin (dari parafin I s.d parafin terakhir)

Lampiran C
(normatif)
Prosedur pewarnaan *hematoxylen - eosin*

– <i>xylol</i> I	15 menit
– <i>xylol</i> II	15 menit
– <i>xylol</i> III	10 menit
– alkohol absolut I	10 menit
– alkohol absolut II	10 menit
– alkohol 95 %	5 menit
– alkohol 90 %	5 menit
– alkohol 70 %	3 menit
– air mengalir (<i>tap water</i>)	2 menit
– akuades (DW)	3 menit
– hematoxylen (<i>delafield</i>)	50 detik - 1 menit, (mayer) = 1,5 menit
– air mengalir (<i>tap water</i>)	8 menit
– akuades (DW)	3 menit
– eosin	30 menit
– alkohol 70 %	1 menit
– alkohol 90 %	1 menit
– alkohol 95 %	1 menit
– alkohol absolut I	1 menit
– alkohol absolut II	1 menit
– alkohol <i>xylene</i>	1 menit (alkohol : <i>xylene</i> =1:1)
– <i>xylol</i> I	3 menit
– <i>xylol</i> II	5 menit
– <i>xylol</i> III	5 menit
– <i>cover</i>	

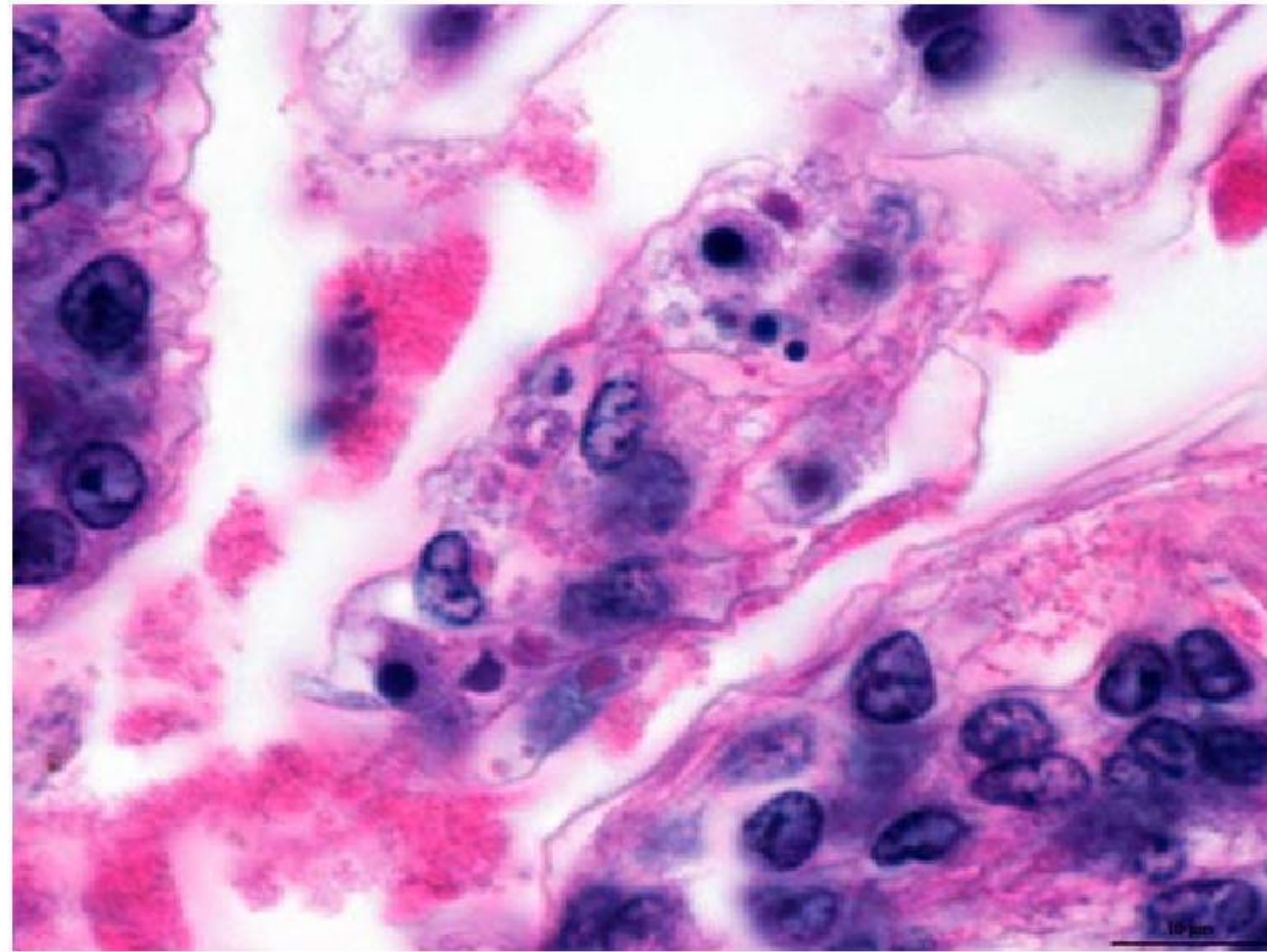
CATATAN alkohol 70 % dan 90 % setelah *eosin* jangan diganti atau warna tetap merah.

Lampiran D
(informatif)
Contoh gambaran hispatologi udang penaeid

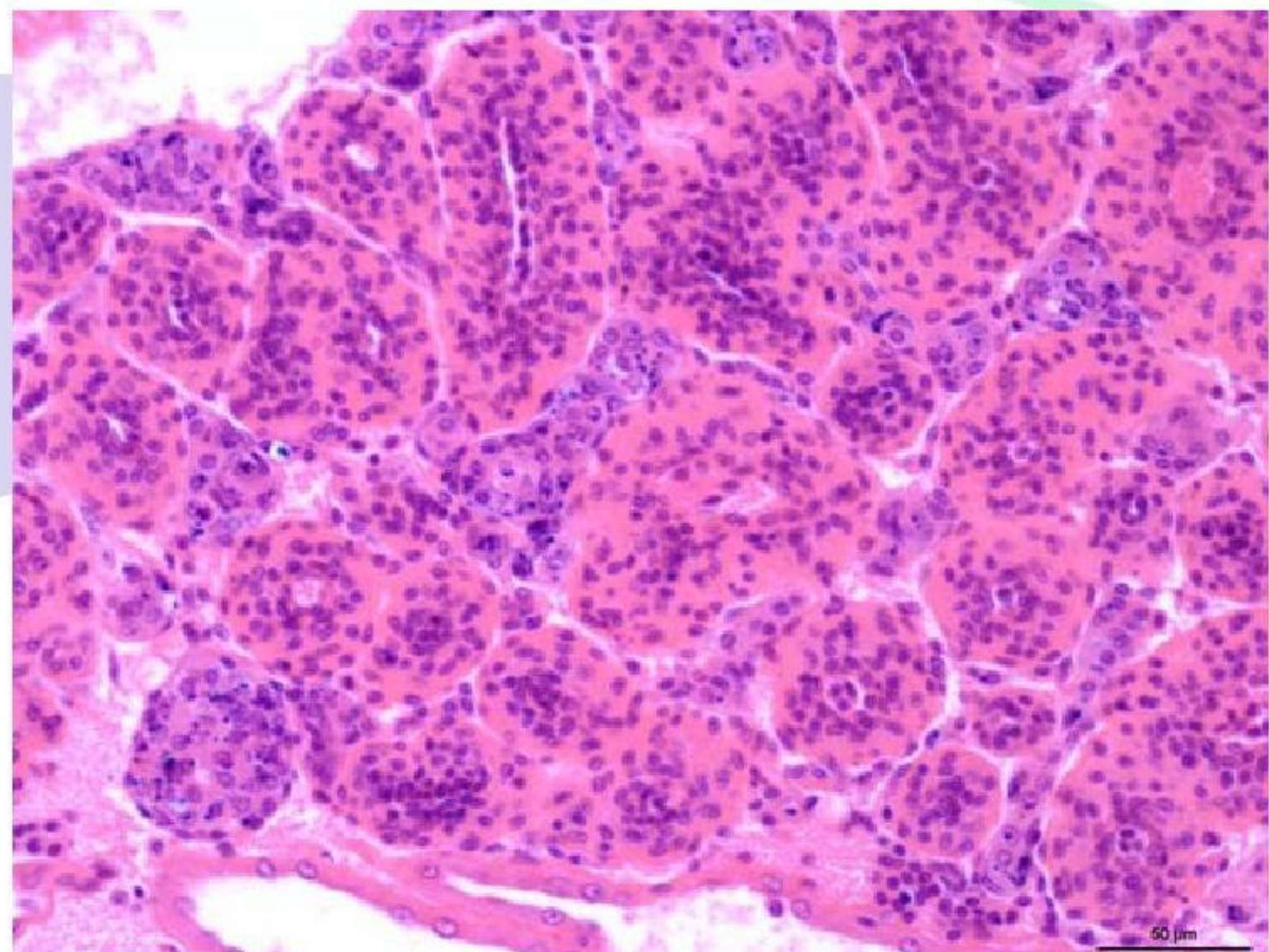


Gambar D.1 - Fase akut lesi TSV dalam epidermis subkutikular dari *P.vannamei* (A dan B)

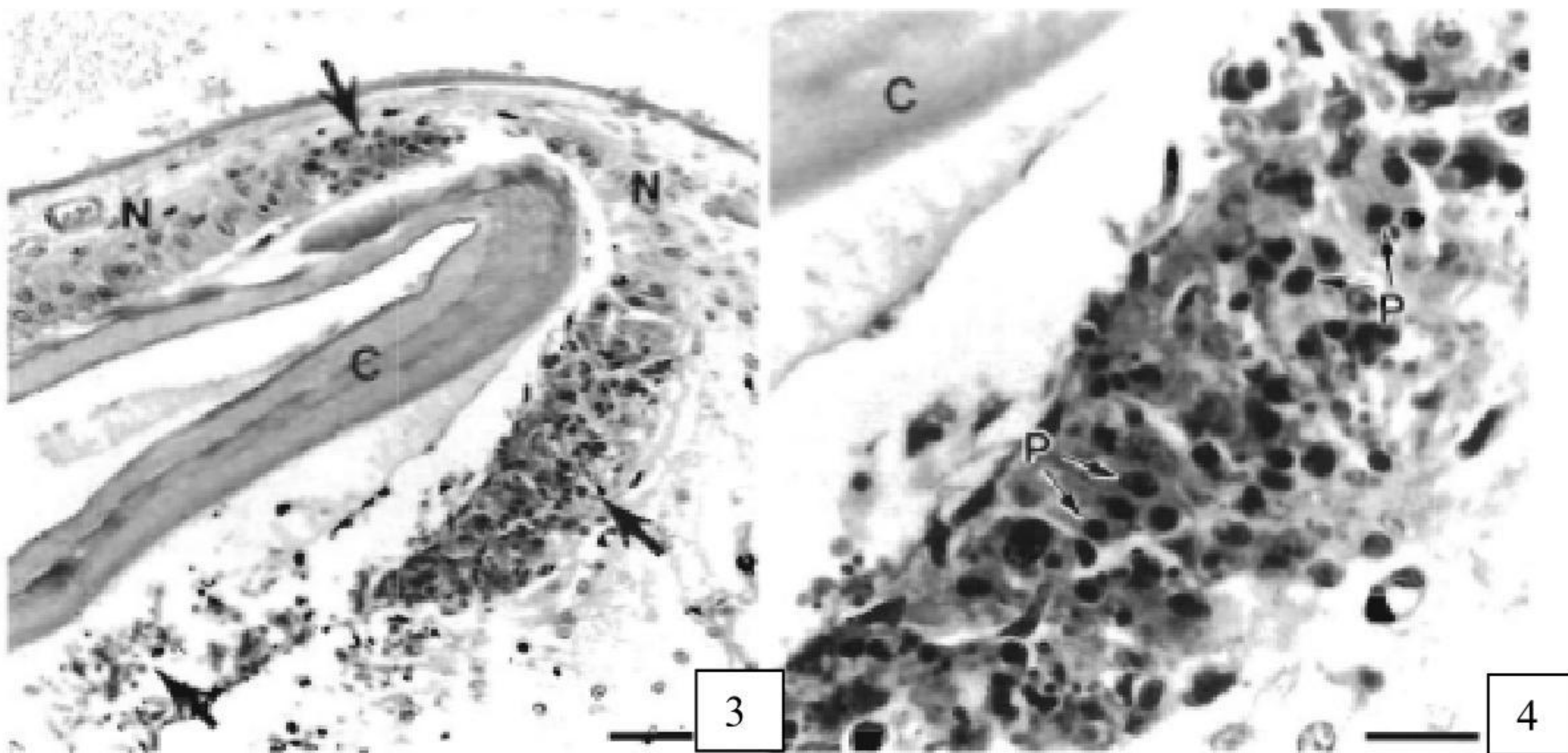
A



B



Gambar D.2 - Fase akut lesi TSV pada sel epidermis insang dari *P.vannamei* (A) dan Fase lesi kronis dari organ limfoid dari *P.vannamei* dengan *detail sferoid* dalam gambar inset (B)



Keterangan gambar:

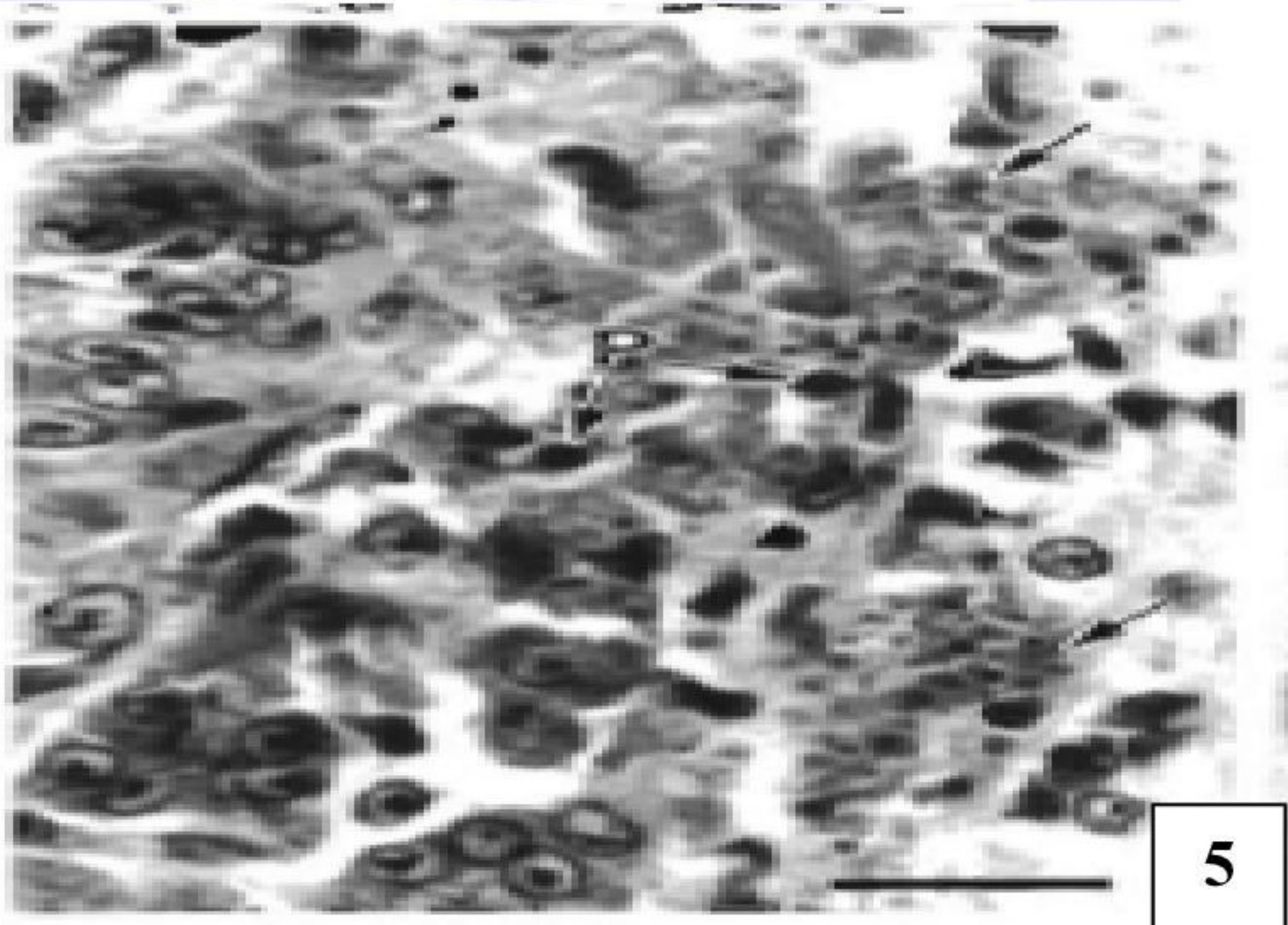
C : Kutikula

N : Menunjukkan epitel normal

P : Sel dengan piknotik

Tanda panah menunjukan sel-sel epitel

Gambar D.3 dan D.4 - Jaringan pengikat sub kutikula pada organ insang

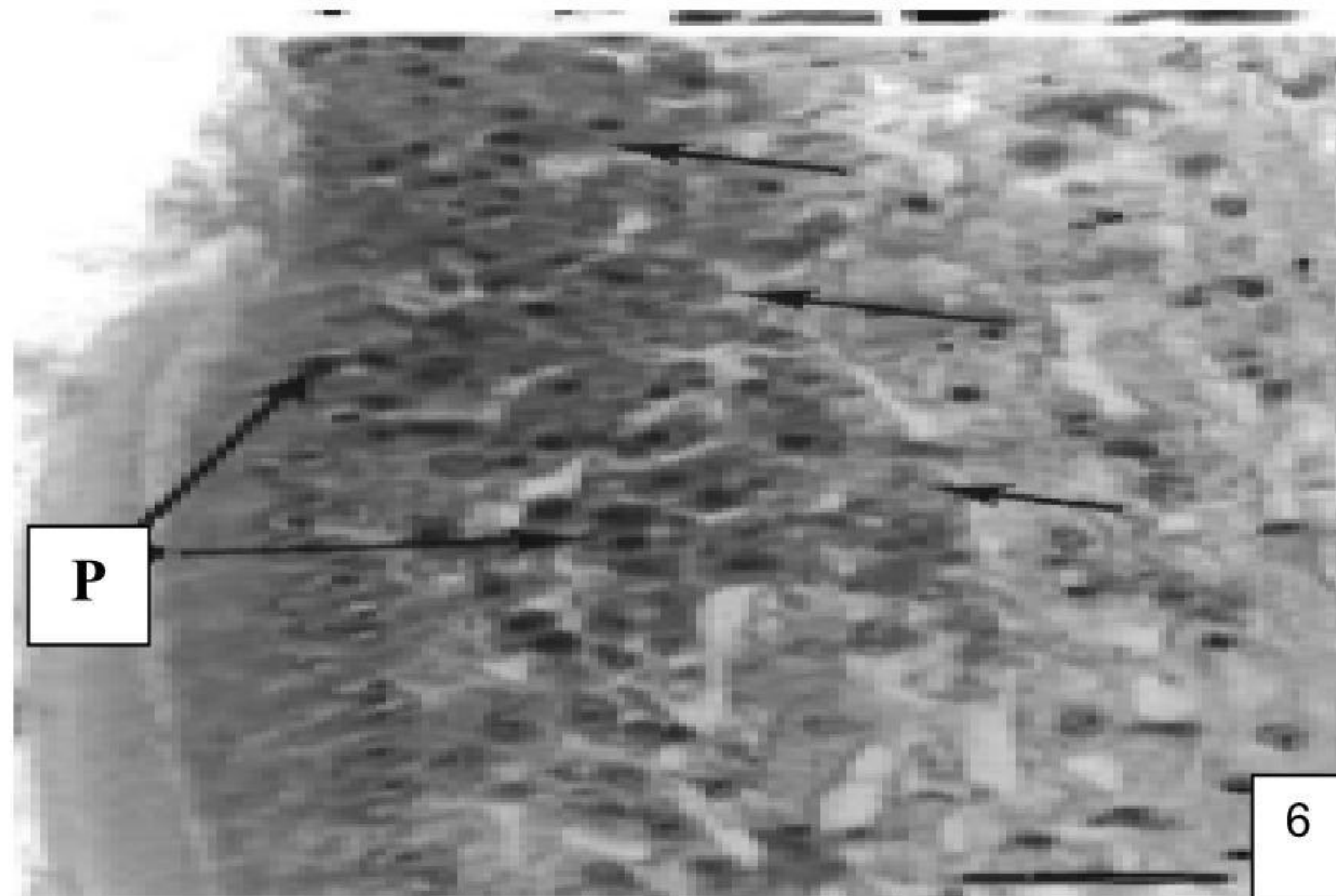


Keterangan gambar :

P : Sel dengan piknotik

Tanda panah menunjukan sel-sel epitel

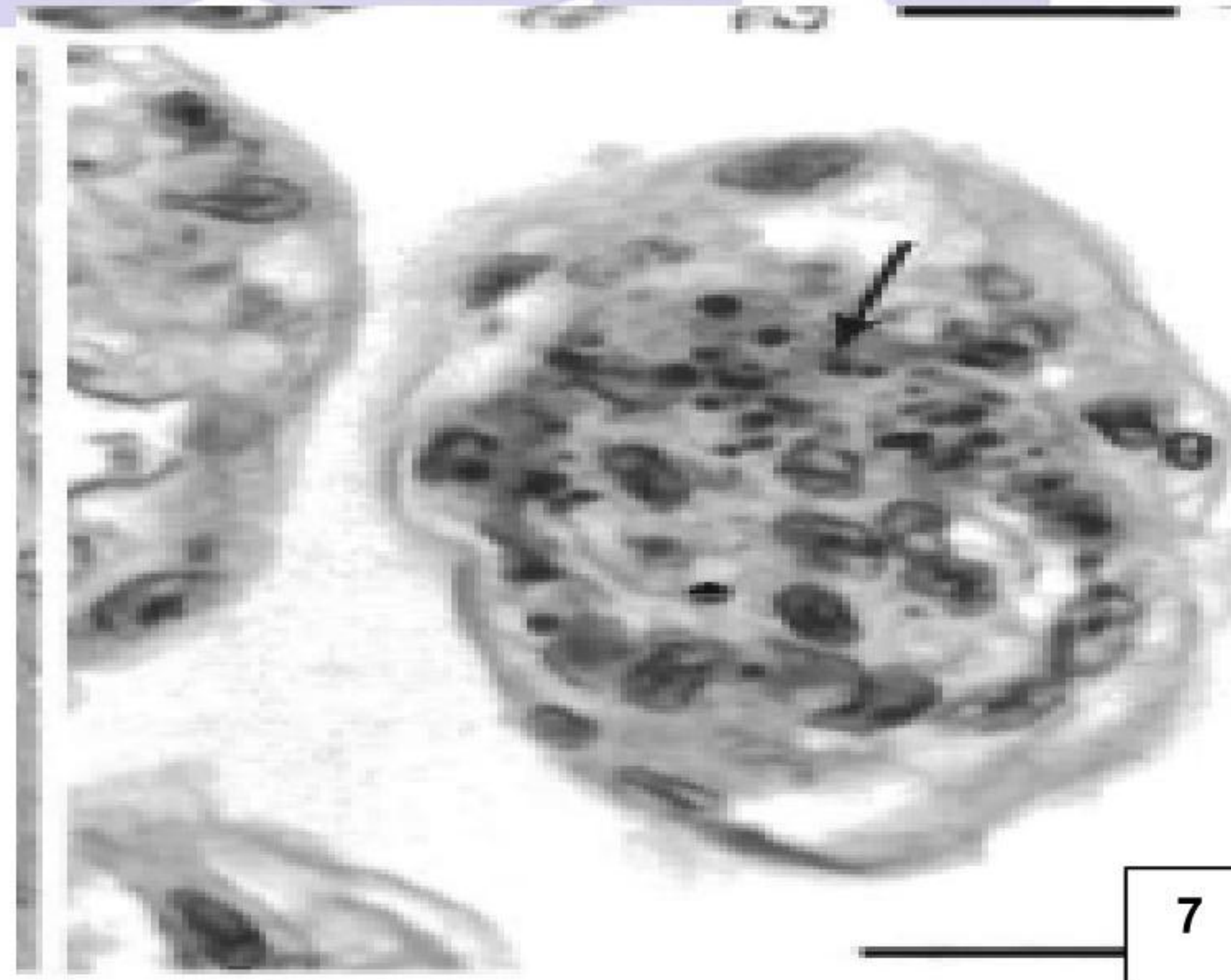
Gambar D. 5 - Jaringan yang mengalami lesi akut *focal* pada lambung



Keterangan gambar :

P : Sel dengan piknotik
Tanda panah menunjukan sel-sel epitel

Gambar D.6 - Jaringan yang mengalami lesi akut *focal* pada karapak



Gambar D. 7 - Jaringan yang mengalami lesi akut *focal* pada insang

Bibliografi

Lightner, D. V., R.M. Redman, K. W. Hasson, & C. R. Pantoja. 1995. *Taura Syndrome in Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda): Gross Signs, Histopathology And Ultrastructure*. *Dis. aquat. Org.* 21: 53-59.

Manual Diagnostic Test for Aquatic Animal. OIE. Chapter 2.3.1.2006.

Pusat Karantina Ikan, 2008, Metode Standar Pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Virus.44 .pp











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id